

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-245181

(43)Date of publication of application : 28.09.1990

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

(21)Application number : 01-066794

(71)Applicant : DAINIPPON PRINTING CO LTD

(22)Date of filing : 18.03.1989

(72)Inventor : MATSUO MAKOTO
UCHIUMI MINORU

(54) METHOD FOR CULTURING CELL WITH ELECTROSTATIC CHARGE PATTERN

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable realization of a neurocomputer by carrying out cell culture in an electric charge pattern suitable for the objective cell by using an electric charge holding medium capable of freely setting the electric charge pattern with a specific construction.

CONSTITUTION: A photosensitive substance 104 having a photoconductive layer (104c) formed through an electrically conductive layer (104b) on a support (104a) is initially placed opposite to an electric charge holding medium 105 having an insulating layer (105a) formed through an electrically conductive layer (105b) on a support (105c). Exposure to an image is then carried out from the side of the photosensitive substance 104 while applying a voltage across the electrically conductive layers (104b) and (105b) of the photosensitive substance 104 and the medium 105 to accumulate electric charges in the form of the image on the surface of the medium 105. Cell culture is simultaneously carried out on the medium 105 having the electrostatic charge pattern formed thereon.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-245181

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)9月28日

C 12 N 5/06

8515-4B C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑭ 発明の名称 静電荷パターンによる細胞培養方法

⑰ 特 願 平1-66794

⑱ 出 願 平1(1989)3月18日

⑲ 発 明 者 松 尾 誠 東京都新宿区市谷加賀町1丁目1番1号 大日本印刷株式会社内

⑲ 発 明 者 内 海 実 東京都新宿区市谷加賀町1丁目1番1号 大日本印刷株式会社内

⑲ 出 願 人 大日本印刷株式会社 東京都新宿区市谷加賀町1丁目1番1号

⑲ 代 理 人 弁理士 蛭川 昌信 外5名

明 細 書

1. 発明の名称

静電荷パターンによる細胞培養方法

2. 特許請求の範囲

(1) 導電性層を介在させて支持体上に光導電性層を形成した感光体と、導電性層を介在させて支持体上に絶縁層を形成した電荷保持媒体とを対向配置し、感光体および電荷保持媒体の導電性層間に電圧を印加しながら感光体側から画像露光を行って表面に画像状に電荷を蓄積させた電荷保持媒体上で細胞培養を行うことを特徴とする静電荷パターンによる細胞培養方法。

(2) 前記電荷保持媒体は表面に保護膜を形成した請求項1記載の静電荷パターンによる細胞培養方法。

(3) 前記電荷保持媒体は内部電荷保持型である請求項1記載の静電荷パターンによる細胞培養方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は静電荷パターンを形成した電荷保持媒体上に生体組織を付着させ、組織のイオン性相互作用を利用して細胞培養を行うようにした静電荷パターンによる細胞培養方法に関するものである。

〔従来の技術〕

一般に単離した組織細胞を培養する場合、多くは人工基質に接着しないと増殖できない。細胞が増殖するためにはさまざまな環境要因が影響するので、基質との接着はその一つの要因にしかすぎないが、少なくとも細胞の基質への粘着、偽足の形成、伸長といった一連の挙動に対して基質の役割は無視しえないと言われている。

ところで、細胞は、細胞膜上のムコ多糖タンパク質複合体、或いは糖鎖末端のシアル酸などにもとづき、全体として負電荷、上皮細胞系で-30~-40 mVを有することが知られており、基質の荷電状態がその接着と増殖に影響を及ぼすと言われている。例えば、Rembaumらは代表的な正電荷(第4級アンモニウム塩)ポリマーであるポリイオネンに対する細胞の接着速度はガラスより大

きいことを示した。またポリHEMAには、細胞接着量は少ないが、20%のメタクリル酸ジエチルアミノエチルを共重合することにより細胞接着性が向上することが報告されている。またMacieira-Coeelhoらはグルタルアルデヒドで固定した仔牛血清アルブミンにイオン性のポリアミノ酸を吸着させた基質上でのマウスLあるいはBHK細胞の増殖を調べ、ポリグルタミン酸、ポリフェニルアラニンのような酸性あるいは中性のポリアミノ酸を吸着した表面では細胞は凝集するのみで増殖しないのに対し、ポリジン、ポリオルニチン、ヒストンなど塩基性のポリアミノ酸あるいはタンパク質を吸着した表面では細胞は単離して増殖することを示した。

このように基材の荷電は、培養細胞の接着、増殖に大きな影響を持ち、定性的には培地中で正電荷を有するような基材表面上では細胞の吸着速度は増大し、負電荷の基材は逆の効果を示す例が多い。一方、正電荷があまり強すぎると、細胞に変性をもたらす増殖を阻害することも知られており、

3

支持体上に光導電性層を形成した感光体と、導電性層を介在させて支持体上に絶縁層を形成した電荷保持媒体とを対向配置し、感光体および電荷保持媒体の導電性層間に電圧を印加しながら感光体側から画像露光を行って表面に画像状に電荷を蓄積させた電荷保持媒体上で細胞培養を行うことを特徴とする。

〔作用〕

本発明は感光体と電荷保持媒体とを使用し、感光体を通して画像露光することにより、電荷保持媒体上に静電荷パターンを形成し、この上で細胞培養を行うものであり、静電荷パターンは露光パターンを変えることにより任意に自由に変わることができるので、目的の細胞に適したパターンで細胞培養を行うことが可能となる。さらに、電荷パターンを回路状に形成し、例えば回路状に神経細胞を増殖させてニューロコンピュータを実現させることも可能である。

〔実施例〕

以下、実施例を図面に基づき説明する。

全面均一電荷の状態では増殖せず、一般的には、アイランド状に電荷を分布させ、かつ電荷の大きさや間隔を細胞によって異ならせることが増殖の条件として必要である。

〔発明が解決しようとする課題〕

ところで、細胞のイオン性相互作用を利用してシャーレ等で細胞培養を行う場合、目的の細胞により電荷パターンや強さを変える必要があるが、従来、電荷パターンを自由に設定できる媒体がなく、そのため細胞培養に最適な電荷パターンはどのようなものか等十分解明することができず、研究の進展の上で障害の一つとなっていた。

本発明は上記問題点を解決するためのもので、細胞培養のための電荷パターンを、その強度、間隔等を簡単に自由に設定することができ、細胞培養技術の発展への貢献度が極めて大きい静電荷パターンによる細胞培養方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

そのために本発明は、導電性層を介在させて支

4

第1図は本発明の静電荷パターンによる細胞培養方法に使用するシャーレの斜視図、第2図は第1図のシャーレの底面に形成した静電荷パターンを示す図、第3図は本発明の静電荷パターン形成方法を説明するための図である。図中、101はシャーレ、103は試料、104は感光体、104aは支持体、104bは感光体電極、104cは光導電層、105は電荷保持媒体、105aは絶縁層、105bは電極、105cは支持体、107、111は電荷パターン、109、113は増殖細胞、120は保護層、121は微粒子である。

本発明における培養方法は、第1図に示すように、シャーレ101の底面に電荷保持媒体105を使用し、この電荷保持媒体上に任意の静電荷パターンを形成し、このシャーレの中に血液、体液等の単離した生体組織を入れて培養するものである。

先ず、第3図により電荷保持媒体への静電荷パターンの形成方法について説明する。

5

6

第3図(a)において、1mm厚のガラスからなる光導電層支持体104a上に1000Å厚のITOからなる透明な感光体電極104bを形成し、この上に10μm程度の光導電層104cを形成して感光体104を構成する。この感光体104に対して、10μm程度の空隙を介して電荷保持媒体105を配置する。電荷保持媒体105は1mm厚のガラスからなる絶縁層支持体105c上に1000Å厚のAl電極105bを蒸着により形成し、この電極105b上に10μm厚の絶縁層105aを形成する。そして、電源Eにより電極104b、105b間に電圧を印加する。暗所であれば光導電層104cは高抵抗体であるため、電極間には何の変化も生じない。感光体104側より光を入射すると、光が入射した部分の光導電層104cは導電性を示し、絶縁層105aとの間に放電が生じ、絶縁層上に電荷が蓄積される。この場合、感光体への入射光量、入射光パターンを変えることにより、絶縁層上に形成される電荷量、電荷パターンを任意に変えることができる。

7

ポリアクリルゴム、クロロスルホン化ポリエチレン、エチレン・プロピレンラバー、弗素ゴム、シリコンラバー、多硫化系合成ゴム、ウレタンゴム等のゴムの単体、あるいは混合物が使用される。

またシリコンフィルム、ポリエステルフィルム、ポリイミドフィルム、含弗素フィルム、ポリエチレンフィルム、ポリプロピレンフィルム、ポリパラベン酸フィルム、ポリカーボネートフィルム、ポリアミドフィルム等を電荷保持媒体電極105b上に接着剤等を介して貼着することにより層形成させるか、あるいは熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂、紫外線硬化性樹脂、電子線硬化性樹脂、ゴム等に必要な硬化剤、溶剤等を添加してコーティング、ディッピングすることにより層形成してもよい。

また絶縁層として、ラングミュア・ブロッコット法により形成される単分子膜、または単分子累積膜も使用することができる。

またこれら絶縁層には、電極面との間、または絶縁層上に強電界(10⁴ V/cm以上)が印加

次ぎに、電荷保持媒体材料、および電荷保持媒体の作製方法について説明する。

絶縁層105aは、その表面、もしくはその内部に情報を静電荷の分布として記録するものであるから、電荷の移動を抑えるため高絶縁性が必要であり、比抵抗で10¹⁴Ω・cm以上の絶縁性を有することが要求される。このような絶縁層は、樹脂、ゴム類を溶剤に溶解させ、コーティング、ディッピングするか、または蒸着、スパッタリング法により層形成させることができる。

樹脂、ゴムとしては、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ビニル樹脂、スチロール樹脂、アクリル樹脂、ナイロン66、ナイロン6、ポリカーボネート、アセタールホモポリマー、弗素樹脂、セルロース樹脂、フェノール樹脂、ユリア樹脂、ポリエステル樹脂、エポキシ樹脂、可溶性エポキシ樹脂、メラミン樹脂、シリコン樹脂、フェノキシ樹脂、芳香族ポリイミド、PPO、ポリスルホン等、またポリイソブレン、ポリブタジエン、ポリクロロブレン、イソブチレン、極高ニトリル、

8

された時には電荷が注入するが、低電界(10⁴ V/cm以下)では電荷が注入しない電荷保持強化層を設けることができ、例えばSiO₂、Al₂O₃、SiC、SiN等が使用でき、有機系物質としては例えばポリエチレン蒸着膜、ポリパラキシレン蒸着膜が使用できる。

また静電荷をより安定に保持させるために、絶縁層に、電子供与性を有する物質(ドナー材料)、あるいは電子受容性を有する物質(アクセプター材料)を添加するとよい。ドナー材料としてはステレン系、ピレン系、ナフタレン系、アントラセン系、ビリジン系、アジン系化合物があり、具体的にはテトラチオフルバレン(TTF)、ポリビニルビリジン、ポリビニルナフタレン、ポリビニルアントラセン、ポリアジン、ポリビニルピレン、ポリスチレン等が使用され、一種、または混合して用いられる。またアクセプター材料としてはハロゲン化合物、シアン化合物、ニトロ化合物等があり、具体的にはテトラシアノキノジメタン(TCNQ)トリニトロフルオレノン(TNF)等が

使用され、一種、または混合して使用される。ドナー材料、アクセプター材料は、樹脂等に対して0.001~10%程度添加して使用される。

さらに電荷を安定に保持させるために、電荷保持媒体中に元素単体微粒子を添加することができる。元素単体としては周期律表第ⅠA族(アルカリ金属)、同ⅠB族(銅族)、同ⅡA族(アルカリ土類金属)、同ⅡB族(亜鉛族)、同ⅢA族(アルミニウム族)、同ⅢB族(希土類)、同ⅣB族(チタン族)、同ⅤB族(バナジウム族)、同ⅥB族(クロム族)、同ⅦB族(マンガン族)、同Ⅷ族(鉄族、白金族)、また同ⅣA族(炭素族)としては珪素、ゲルマニウム、錫、鉛、同ⅤA族(窒素族)としてはアンチモン、ビスマス、同ⅥA族(酸素族)としては硫黄、セレン、テルルが微細粉状で使用される。また上記元素単体のうち金属類は金属イオン、微細粉状の合金、有機金属、錯体の形態としても使用することができる。更に上記元素単体は酸化物、磷酸化物、硫酸化物、ハロゲン化物の形態で使用することができる。こ

11

使用して貼着するとよく、比抵抗 $10^{14}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上のものであればよく、膜厚は0.5~30 μm 程度であればよい。

また、第3図(c)(d)に示すものは、絶縁層105aの表面近傍に光導電性または導電性微粒子層121を埋め込んでおき、第3図(a)に示したと同様に表面電荷を形成した後、第3図(c)に示すように全面均一露光する。表面電荷の形成により、電荷保持媒体の電極105bにも逆極性の電荷誘起され、その結果、微粒子内には表面電荷と電極に誘起した電荷に起因する電界が生じているので、電荷が形成された部分においては光の入射により微粒子内にキャリアが発生し、(一)電荷は表面電荷と中和し、第3図(d)に示すように微粒子内に(+)の電荷が残る、結果的に表面電荷が注入されたことになる。こうすることにより、血液等に触れても電荷のリークが生ずることはない。

なお、電荷を蓄える微粒子としては光導電性材料、導電性材料から形成される。

13

これらの添加物は、上述した樹脂、ゴム等の電荷保持媒体にごく僅か添加すればよく、添加量は電荷保持媒体に対して0.01~10重量%程度でよい。また絶縁層は、絶縁性の点からは少なくとも1000 \AA (0.1 μm)以上の厚みが必要であり、フレキシビリティの点からは100 μm 以下が好ましい。

ところで本発明においては、電荷保持媒体は血液等の導電性のものに触れて使用される。電荷保持媒体上の電荷は絶縁層上にある限り長期間保存されるが、導電性液体等に触れるとリークしてしまう。そこで、第3図(b)に示すように絶縁性の保護膜120で覆うようにする。この上に生体組織を付着させるようにすれば電荷バターンを保存することができるので、細胞培養を行うことが可能である。

保護膜としては粘着性を有するシリコンゴム等のゴム類、ポリテルペン樹脂等の樹脂類をフィルム状にし、絶縁層の表面に貼着するか、またプラスチックフィルムをシリコンオイル等の密着剤を

12

光導電性微粒子材料としてはアモルファスシリコン、結晶シリコン、アモルファスセレン、結晶セレン、硫化カドミウム、酸化亜鉛等の無機系光導電材料、またポリビニルカルbazool、フクロシアニン、アゾ系顔料等の有機系光導電材料が使用される。

また導電性材料としては、周期律表第ⅠA族(アルカリ金属)、同ⅠB族(銅族)、同ⅡA族(アルカリ土類金属)、同ⅡB族(亜鉛族)、同ⅢA族(アルミニウム族)、同ⅢB族(希土類)、同ⅣB族(チタン族)、同ⅤB族(バナジウム族)、同ⅥB族(クロム族)、同ⅦB族(マンガン族)、同Ⅷ族(鉄族、白金族)、また同ⅣA族(炭素族)としては炭素、珪素、ゲルマニウム、錫、鉛、同ⅤA族(窒素族)としてはアンチモン、ビスマス、同ⅥA族(酸素族)としては硫黄、セレン、テルルが微細粉状で使用される。また上記元素単体のうち金属類は金属イオン、微細粉状の合金、有機金属、錯体の形態としても使用することができる。更に上記元素単体は酸化物、磷酸化

14

物、硫酸化物、ハロゲン化物の形態で使用する
ことができる。特に炭素、金、銅、アルミニウム等
が好ましく使用される。

この微粒子層の形成方法は、微粒子層を樹脂層
表面内近傍に単層状、或いは複数層状に積層した
ものは、低圧蒸着装置を使用し、粒子層形成材料
を、支持体上に積層した、未硬化、熔融、或いは
軟化した状態の樹脂層上に蒸着させることにより
形成される。粒子層形成材料は、 $10\text{Torr} \sim 10^{-3}\text{Torr}$
程度の低圧下で蒸発させると凝集し、 $10 \sim 0.1$
 μm 程度の超微粒子状態となり、蒸着の際に樹
脂層を加熱により軟化した状態としておくと、微
粒子は樹脂層表面の内部近傍に、単層状、或いは
複数層状に整列した状態で積層されるものである。
樹脂層が熱可塑性樹脂であれば樹脂層を電極層を
抵抗加熱することにより軟化させるか、又はヒー
ター等で基板を直接加熱し、樹脂層を軟化させ、
また樹脂層が熱硬化性樹脂、紫外線硬化性樹脂、
電子線硬化性樹脂であれば、未硬化の状態に粒子
層形成材料を蒸着させ、粒子層形成後に適宜の硬

化手段で硬化させるものである。

また樹脂層表面内近傍に微粒子層を形成する別
の手段として、予め電極基板上に該樹脂層を形成
硬化ならしめた支持体上に同様の方法で粒子層を
単層、或いは複数層状に蒸着させる。この場合、
粒子層は樹脂層表面に形成される。しかる後、該
樹脂層形成に用いた同一樹脂、或いは異なる絶縁
性樹脂を $0.1 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ の範囲で積層させるも
のであり、積層方法としては、ドライ方式として
は真空蒸着、スパッタリング法等で樹脂層を直接
形成させるか、ウェット方式としては溶剤により
樹脂を溶解させた溶液を使用し、スピンナーコー
ティング、ディッピング、ブレードコーティング
法等により膜形成した後、溶剤を乾燥させればよ
い。また粒子層の形成時に粒子サイズを均一にな
らしめるために、樹脂層が熔融しない程度の温度
を基板上加えてもよい。

この他にも図示は省略するが、絶縁層の上にさ
らに 1000\AA 以下の薄い絶縁膜を積層してこの
上に電荷を形成すると、この電荷と逆極性の電荷

15

が電極上に形成され、その電荷との間で生ずる内
部電界により、表面電荷がトンネル効果で薄い絶
縁層を通して内部に入るので、この場合も血液等
の導電性のものを表面に接触させても内部電界が
リークしてしまうのを防ぐことができる。

第2図は第3図に示した方法で電荷パターンが
形成された電荷保持媒体を示し、第2図(a)の
場合は、比較的小さな電荷パターンを形成した場
合で、その周りに増殖細胞109が形成されている。

第2図(b)は比較的大きな電荷パターンを形
成した場合で、その周りに別の増殖細胞109が
形成されている。

第2図は左半分と右半分とで電荷の大きさを変
えたものであり、異なる成分を増殖させたり、成
分の分離を行わせることができる。なお、電荷パ
ターンを回路状に形成し、例えば回路状に神経細
胞を増殖させてニューロコンピュータを実現させ
ることも可能である。

〔発明の効果〕

17

16

以上のように本発明によれば、感光体を通して
画像露光することにより電荷保持媒体上に任意の
電荷パターンを形成し、この上で細胞培養を行う
ようにしたので、様々な電荷パターンに対応した
細胞培養を行うことが可能であり、回路状に神経
細胞を増殖させればニューロコンピュータを実現
させることも可能である。

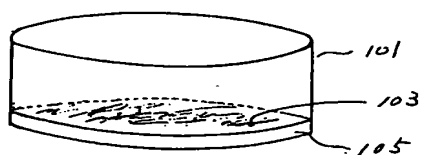
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の静電荷パターンによる細胞培
養方法に使用するシャーレの斜視図、第2図は第
1図のシャーレの底に形成した静電荷パターンを
示す図、第3図は本発明の静電荷パターン形成方
法を示す図である。

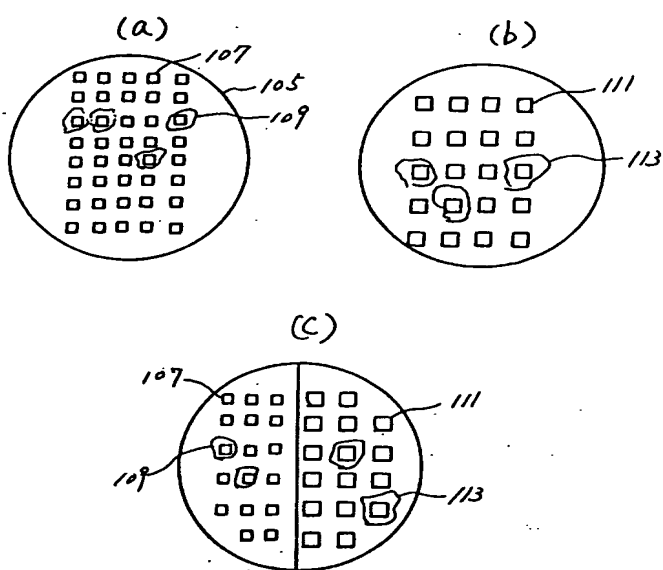
101…シャーレ、103…試料、104…感
光体、104a…支持体、104b…感光体電極、
104c…光導電層、105…電荷保持媒体、1
05a…絶縁層、105b…電極、105c…支
持体、107、111…電荷パターン、109、
113…増殖細胞、120…保護層、121…微
粒子。

18

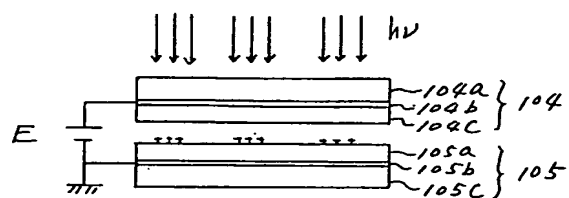
第1図



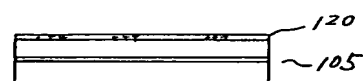
第2図



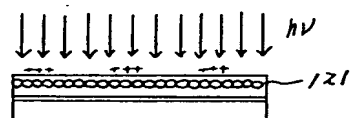
第3図 (a)



(b)



(c)



(d)

